

# Prozesstechnische Aspekte der Produktion von Antibiotika gezeigt am Beispiel von Cephalosporin C

Schügerl, Karl

Veröffentlicht in:  
Jahrbuch 2001 der Braunschweigischen  
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.49-52



J. Cramer Verlag, Braunschweig

KARL SCHÜGERL, Hemmingen

## Prozesstechnische Aspekte der Produktion von Antibiotika gezeigt am Beispiel von Cephalosporin C

Braunschweig, 12.10.2001\*

Die meisten Antibiotika werden von Streptomyceten und Schlauchpilzen gebildet, die filamentöse Myzelien bilden. Diese Morphologie der Mikroorganismen verursacht hochviskose Kultivierungsmedien mit nicht-newtonscher Rheologie, die den Herstellungsprozess erheblich beeinträchtigen. Des weiteren lässt sich der Produktionsprozess in zwei deutliche Phasen aufteilen: auf eine Wachstumsphase und eine Produktbildungsphase, da die Biosynthese des Antibiotikums mit dem Wachstum nicht gekoppelt ist. Ich möchte heute einige Probleme dieser Produktion am Beispiel der Herstellung von Cephalosporin diskutieren.

1945 fand Giuseppe Brotzu einen aus Kloakenabwässern isolierten Schimmelpilz *Cephalosporium acremonium brotzu*, der ein neuartiges, gegen *Staphylococcus aureus* und *Salmonelle typhi* wirksames Antibiotikum ausschied. Von Newton und Abraham wurden in den 50er Jahren das Cephalosporin C und dessen Vorläufer „Cephalosporin N“ (Penicillin N) isoliert und charakterisiert.

Cephalosporin C ist ein Sekundärmetabolit des aeroben Pilzes, *Acremonium chrysogenum*, ein natürlich vorkommendes, nur schwach wirksames Antibiotikum mit einem  $\beta$ -Lactam- und einem Dihydrothiazinring und einer Seitenketten-Gruppe. Es wird gegenwärtig biotechnologisch unter Verwendung von Hochleistungsstämmen als Vorläufer für wirksame halbsynthetische Cephalosporine produziert, da eine organisch-chemische Totalsynthese nicht konkurrenzfähig ist.

Die Optimierung der Produktion dieses Antibiotikums beinhaltet die Erhöhung der Produktivität des Stammes durch Mutation und Verbesserung des Produktionsprozesses. Die Vorbedingung einer hohen Produktkonzentration ist hohe Biomassenkonzentration und hohe Produktivität des Pilzes. Die Prozessbedingungen für das optimale Wachstum und für die optimale Produktbildung sind jedoch sehr unterschiedlich. Daher benötigt man eine gut durchdachte Strategie, um beide Bedingungen zu erfüllen. Des weiteren muss das Produkt hohe Qualität und geringen Preis haben, um das Antibiotikum auf dem Markt absetzen zu können.

Bei der Produktion von Cephalosporin C betragen die Rohstoffkosten, wie bei den meisten biotechnologischen Produktionsprozessen von primären und sekundären Metaboliten, ca. 60 % der gesamten Kosten. Der zweitwichtigste Kostenfaktor ist der Energiebedarf.

Die Voraussetzung eines preisgünstigen Herstellungsverfahrens ist die Verwendung billiger Rohstoffe. Daher werden landwirtschaftliche Nebenprodukte, wie Maisquellwasser, Pharmamedium, Erdnussmehl, usw. zur Kultivierung verwendet.

---

\* Vortrag gehalten in der Klasse für Mathematik und Naturwissenschaften der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft

Diese komplexen Medien haben noch den Vorteil gegenüber synthetischen Medien, dass sie verschiedene Wachstumsfaktoren beinhalten. Daher sind die mit ihnen erreichbaren Produktivitäten erheblich höher als die mit synthetischen Medien.

Um das Reaktordvolumen gut auszunutzen, werden hohe Biomassenkonzentration und kurze Produktionszeiten, d.h. hohe Wachstumsraten des Pilzes angestrebt, die durch Anwendung hoher Substratkonzentration erreicht werden. Die hohen Konzentrationen des Substrates und des filamentösen Myzelium bildenden Pilzes verursachen ein hochviskoses Medium, das gut durchmischt und begast werden muss, um den Pilz mit Substrat (Energiequelle) und Sauerstoff ausreichend zu versorgen. Die Fließgrenze und die Viskosität des Kultivierungsmediums erreichen ein Maximum am Ende der Wachstumsphase, bei der die Endbiomassekonzentration erreicht wird. Danach nehmen beide ab. Während der Kultivierung wird die Substratkonzentration vermindert, auch die Morphologie des Pilzes ändert sich am Ende der Wachstumsphase und das filamentöse Myzelium zerfällt in kugelförmige Arthrosporen, die ebenfalls zur geringen Viskosität des Mediums führt. Daher nehmen die Viskosität und die Fließgrenze am Ende der Wachstumsphase ab und der benötigte Leistungseintrag wird erheblich vermindert.

Wie beeinflussen die Prozessparameter das Wachstum und die Produktbildung?

Die Zusammensetzung des Mediums hat einen großen Einfluß auf die Produktbildung im Gegensatz zu seinem Einfluß auf das Wachstum. Die Ermittlung der optimalen Medium-Zusammensetzung wird durch aufwendige Untersuchungen ermittelt. Die anfängliche hohe Konzentration der schnell verstoffwechselbaren Glucose muss am Ende der Wachstumsphase stark reduziert werden, um die Produktbildung zu starten. Diesen Effekt nennt man katabolitische Repression. Man kann die Produktbildung später stoppen, wenn die Verbrauchsrate von Glucose über  $0.4 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erhöht wird. Die Produktbildung wird neu gestartet, wenn diese Grenze unterschritten wird. Auch die Phosphatkonzentration muss am Ende der Wachstumsphase reduziert werden. Daher wurden früher nach der Wachstumsphase langsam verstoffwechselbare Energiequellen, wie Laktose oder Erdnussmehl, verwendet. In der modernen Praxis wird schnell verstoffwechselbare Energiequelle dem Reaktor in der Weise langsam zugefüttert, dass die kritische Verbrauchsrate unterschritten wird und keine Katabolitrepression auftritt. Wird die Gelöstsauerstoffkonzentration reduziert, verschiebt sich das Verhältnis dieser Verbindungen. Die Konzentration der Zwischenstufen Isopenicillin N und Penicillin N steigen an und die Konzentration des Endproduktes, Cephalosporin C vermindert sich. Man kann erkennen, dass die Biosynthese bei Deacetoxycephalosporin C-Synthetase blockiert wird (Abb. 1).

Es ist sehr schwierig in allen Bereichen der  $100 \text{ m}^3$  Produktionsanlage den Pilz mit Sauerstoff ausreichend zu versorgen. Die Erhöhung der Rührerdrehzahl zur Verbesserung des Sauerstoffeintrages ist wegen der hohen Viskosität und der nicht-Newtonschen Rheologie des Kultivierungsmediums nur bedingt anwendbar. Durch Vergrößerung des Rührerdurchmessers lässt sich die Sauerstoffeintragsrate erheblich verbessern. Der Leistungseintrag nimmt jedoch mit dem Rührerdurchmesser stark zu. Wegen der zu hohen Energiekosten muss die partielle schlechte Sauerstoffversorgung des Pilzes in Kauf genommen werden. Neben der Zunahme der Konzentrationen von Isopenicillin N und Penicillin N steigt auch die Konzentration von Desacetoxycephalosporin C an. Die Entfernung

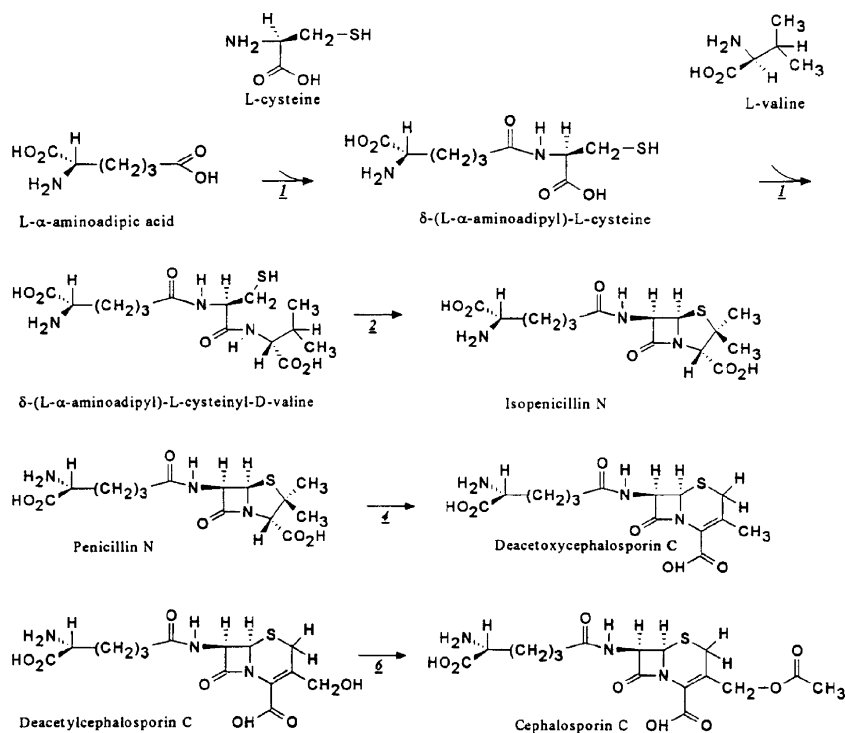


Abb. 1: Die Biosynthese von Cephalosporin C

dieser Vorstufe aus dem Endprodukt ist sehr aufwendig. Bei der Ermittlung des optimalen Rührerdurchmessers spielen daher neben den Energiekosten auch die Isolierungs- und Reiningungskosten des Produktes eine Rolle.

Will man die Produktivität erhöhen, muss man den Engpass der Biosynthese identifizieren und versuchen ihn zu erweitern. Dazu wurde die Zellmasse aufgeschlossen und die Konzentrationen der Zwischenstufen und intrazellulären Enzymaktivitäten der Biosynthese *in vitro* bestimmt.

Da in der aufgeschlossenen Zellmasse alle Enzyme anwesend sind und sich die Enzymaktivitäten teils erheblich unterscheiden, ist es sehr schwierig quantitative Ergebnisse zu erzielen. Durch die anwesenden Enzyme werden die Vorstufen umgesetzt und durch die freigesetzten Proteasen die Enzyme angegriffen und abgebaut. Bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten muss die Proteaseaktivität reduziert werden. Des Weiteren muss die Aktivität bestimmter Enzyme der Biosynthese selektiv inhibiert werden. So ist die Aktivität von Isopenicillin-Synthetase, das Enzym für die zweite Synthesestufe, um drei Größenordnungen höher als die Aktivität von ACV-Synthetase, das Enzym für die erste Stufe. Daher liess sich ACV nicht nachweisen. Es war nötig, das Isopenicillin-Synthetase selektiv zu inhibieren, um die Kinetik des ACV-Synthetase zu bestimmen. Systematische Untersuchungen waren notwendig zur Auswahl geeigneter Enzyminhibitoren, da auf diesem Gebiet noch keine großen Erfahrungen vorlagen. Der Verlauf der Aktivität von ACV-Synthetase und die Konzentration von ACV während der Kultivierung wurden bestimmt. Zuerst steigen beide an. Nach 70 Stunden beginnen beide sich zu vermindern. Auch die Aktivitäten der anderen Enzyme wurden bestimmt. Die Aktivitäten von Isopenicillin-Synthetase und Acyltransferase sind sehr hoch und die von Expandase und Hydrolase recht gering. Die ACV-Synthese ist der wichtigste Engpass der Biosynthese. In einer späteren Phase verursachen die geringen Aktivitäten der Expandase/Hydrolase einen zweiten Engpass.

Man versucht die Engpässe durch die Erhöhung der Aktivität von ACV-Synthetase und die von Expandase/Hydrolyse mit Gentechnik zu erhöhen. Da die Regulation der Biosynthese, insbesondere die Steuerung der Aktivität dieser Enzyme noch unbekannt ist, lässt sich durch Erhöhung der Enzymaktivitäten noch keine wesentliche Verbesserung erreichen.

Eine mögliche Erhöhung der ACV-Synthese könnte durch die Steigerung der Konzentrationen der Edukte dieser Reaktion erfolgen. Die intrazelluläre Konzentration der Edukte als Funktion der Kultivierungszeit weist darauf hin, dass sie recht gering sind. Daher versuchte man die Produktbildung durch Änderung der Zusammensetzung des Substrates zu verbessern. Durch die Erhöhung der Valin-, Alanin- und Serinkonzentrationen liess sich eine sehr hohe Produktkonzentration und Ausbeute erreichen.

Um die Steuerung und Optimierung des Prozesses zu erleichtern, wurde das Wachstum des Pilzes und die Produktbildung mathematisch modelliert. Mit Ausnahme der Produktkonzentration nach 80 Stunden stimmen die berechneten mit den gemessenen Daten gut überein. Die Abweichung der Cephalosporin C Konzentration in der späten Phase ist bedingt durch eine chemische, d.h. nichtenzymatische Hydrolyse von Cephalosporin C, die im Modell nicht berücksichtigt wurde. Berücksichtigt man diese Reaktion, so stimmen die gemessenen und berechneten Daten gut überein.

Durch systematische Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der Biosynthese und den Prozessbedingungen gelang es die Produktkonzentration von 19 auf 26 g l<sup>-1</sup> und die Ausbeute von 20% auf 37% zu erhöhen.

---

Prof. Dr.rer.nat, Dr.h.c. Karl Schügerl  
Arnumer Kirchstraße 31  
D-30966 Hemmingen